



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12N 15/13, 15/63, C12P 21/02, A61K</b> <b>48/00, C07H 21/04, C07K 14/435</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO96/36714</b>  <b>(43) 国際公開日</b> <b>1996年11月21日 (21.11.96)</b>
<b>(21) 国際出願番号</b> <b>PCT/JP96/01258</b> <b>(22) 国際出願日</b> <b>1996年5月14日 (14.05.96)</b>  <b>(30) 優先権データ</b> <b>特願平7/119589</b> <b>1995年5月18日 (18.05.95)</b> <b>JP</b>  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> <b>資酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)[JP/JP]</b> <b>〒612 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</b> <b>(72) 発明者：および</b> <b>(75) 発明者／出願人 (米国についてののみ)</b> <b>恵美宣彦(EMI, Nobuhiko)[JP/JP]</b> <b>〒466 愛知県名古屋市中昭和区八事本町43番地</b> <b>八事本町団地3棟102号 Aichi, (JP)</b> <b>安部明弘(ABE, Akihiro)[JP/JP]</b> <b>〒455 愛知県名古屋市中港区丸池町2丁目28番地</b> <b>レジデンス田中402号 Aichi, (JP)</b> <b>(74) 代理人</b> <b>弁理士 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.)</b> <b>〒540 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル</b> <b>青山特許事務所 Osaka, (JP)</b>		<b>(81) 指定国</b> <b>AU, BR, CA, CN, JP, KR, MX, RU, US, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b>  <b>添付公開書類</b> <b>国際調査報告書</b>
<b>(54) Title : NUCLEIC ACID MOLECULE FOR TREATING B CELL MALIGNANT TUMOR, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND UTILIZATION OF THE SAME</b>  <b>(54) 発明の名称 B細胞性悪性腫瘍治療用核酸分子、その製造方法および利用</b>  <b>(57) Abstract</b>  <p>A nucleic acid molecule for treating a B cell malignant tumor which is capable of expressing a V<sub>H</sub> protein containing the part III of the complementarity-determining region (CDR) III of an immunoglobulin molecule V<sub>H</sub> specific to human B cell malignant tumor cells; a process for producing the molecules; a medicinal composition containing the molecules as the active ingredient; a protein expressed by the nucleic acid molecule; and a method for treating a B cell malignant tumor and a method for cell-mediated immune enhancement comprising the administration of the nucleic acid molecules.</p>		

(57) 要約

ヒトB細胞性悪性腫瘍細胞に特異的な免疫グロブリン分子のV<sub>H</sub>の相補性決定領域(CDR) I I I 部分を含有するV<sub>H</sub>タンパク質を発現可能な、B細胞性悪性腫瘍治療用核酸分子、その製造方法、該核酸分子を有効成分として含有する医薬組成物、該核酸分子が発現するタンパク質、該核酸分子を投与することよりなるB細胞性悪性腫瘍の治療方法および細胞性免疫増強方法を提供する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PR	プエルトリコ
AT	オーストリア	EE	エストニア	LR	レソト	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LS	レソト	RU	ロシア
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SI	スロベニア
BB	バベス	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア
BE	ベルギー	GE	グルジア	MC	モナコ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドバ	SR	セルビア
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TD	チャド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TH	タイ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CC	中東	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CG	コンゴ	JP	日本	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボアール	KR	韓国	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	KZ	カザフスタン	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国			NO	ノルウェー	VN	ベトナム
CU	キューバ			NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ共和国						

## 明細書

### B細胞性悪性腫瘍治療用核酸分子、その製造方法および利用

#### 発明の技術分野

本発明は、広くは遺伝子治療の分野に関し、特に、B細胞性悪性腫瘍治療用核酸分子、その製造方法および利用に関する。さらに詳しくは、本発明は、ヒトB細胞性悪性腫瘍細胞に特異的な免疫グロブリン分子の(H)鎖可変部領域のイディオタイプ遺伝子を含有する、B細胞性悪性腫瘍の治療に有用な核酸分子およびその製造方法に関する。また、本発明は該核酸分子を有効成分とする細胞性悪性腫瘍の治療に有用な医薬組成物、該核酸分子のコードするタンパク質にも関する。さらに、本発明は、該核酸分子をそれを必要とする対象に投与することよりなるB細胞性悪性腫瘍の治療方法および細胞性免疫増強方法にも関する。

#### 従来技術

悪性リンパ腫は、リンパ組織に発生する悪性腫瘍の総称であるが、病変部の病理組織学的所見から、ホジキン病と非ホジキンリンパ腫とに大別され、後者を主として悪性リンパ腫として扱っている。悪性リンパ腫のほとんどがB細胞由来であり、これらはB細胞性悪性リンパ腫と呼ばれている。

また、白血病の中にもB細胞性白血病は多い。本発明においては、これらのB細胞由来の悪性リンパ腫、白血病等の悪性腫瘍をB細胞性悪性腫瘍と呼ぶ。

これらのB細胞性悪性腫瘍の治療原則は放射線療法と抗癌剤化学療法を

組み合わせて治癒を目指すものであり、近年、成績は向上してきているが、低悪性度リンパ腫では第4ステージで発見されることも多い。低悪性度リンパ腫の完全治癒は困難で、強力な治療を行っても生存率向上に貢献せず、副作用でQuality of Life(QOL)が障害される場合もあり、場合によっては治療しないこともあるとされる。

また、多くの症例において一度は寛解の状態にもっていくことができても、長期的には再発して死亡することが多い。低悪性度リンパ腫の自然歴をみても他の群の悪性リンパ腫より経過が長く、場合によっては十数年かけてゆっくり進行して死に至るものがある。このようなリンパ腫に対して、いくつかの免疫強化療法が検討されている。

Bリンパ球がクローン性に増殖する腫瘍であるB細胞悪性リンパ腫およびB細胞性白血病では、腫瘍細胞がその腫瘍特異的な免疫グロブリン(Ig)を発現している。このIgは正常細胞にはなく、腫瘍クローンに特有なイディオタイプ(Id)を有しているために、一種の腫瘍特異抗原であると考えられる。このIdに対する抗Id抗体が、B細胞リンパ腫に対して有効であることが示されている(Levyら、Blood, 73, 651-661, 1989)。すなわち、B細胞リンパ腫16例について、症例ごとに抗Idモノクローナル抗体を作製し、それらを総量400または500mg投与し、完全寛解1例、部分寛解7例を得ている。

しかし、抗Id抗体投与後、Id陰性の変異細胞が増殖してくる例や、Id分子が消失する抗原変調が起こることが問題とされている。

また、Bリンパ腫細胞が分泌するIgをワクチンとして免疫することにより、弱いながらも抗腫瘍効果を誘導できることが報告されている(Levyら、N. Engl. J. Med., 327, 1209-1215, 1992)。すなわち、Bリンパ腫細胞とマウスミエローマ細胞とを融合させ、

得られたハイブリドーマを用いて、Igを分泌させ、精製後、キャリアタンパクとしてのキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）と結合させ、アジュバントと共に皮下免疫することにより、ある程度の治療効果を有することを明らかにしている。しかし、症例ごとに異なるIgを産生する融合細胞を作製する必要がある、これらの作業に時間と手間がかかり、現実的でない。また、効果が弱く、有効性において不十分である。

つぎに、免疫ベクターをワクチンとして使用する方法が80年代後半より確立され、改良が行われ、遺伝子治療が現実のものとなってきた。この方法は、ウイルス学的手段、物理的手段および化学的手段に大別される。ウイルス学的手段は、ウイルスの、細胞に感染する生活環を利用して任意の遺伝子を細胞に導入するもので、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクターなどが代表的なベクターである。物理的手段としては、マイクロインジェクション、パーティクルガン、エレクトロポレーションなどが挙げられ、これは、直接細胞に遺伝子を入れるので細胞選択性はなく、細胞障害性が強いが、よりよい機器の開発により容易になってきている。化学的手段としては、リピッド、リン酸カルシウム、DNA-蛋白複合体を用いた方法が発表されており、導入細胞に選択性を持たせる方法も提案されている。最近では、直接DNAを生体に投与して遺伝子導入を行う、Naked DNA transferも提案されている（特表平4-504125号）。

Ig分子は、同一の2本の重（H）鎖と2本の軽（L）鎖からなり、それぞれのN末端約110アミノ酸残基から構成される（H）鎖可変部領域（V<sub>H</sub>）と（L）鎖可変部領域（V<sub>L</sub>）が抗原結合部位を形成し、イディオタイプを決定している。

近年、HawkinsらはB細胞リンフォーマのIgのV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>をコードする遺伝子によりsingle chainF<sub>v</sub>をコードする遺伝子を作成し、該遺伝

子をレトロウイルスベクターに導入し、免疫ベクターを作成している

[Journal of Immunotherapy、第14巻、第273～278頁(1993)、WO 94/08008]。

一方、IgのV<sub>H</sub>においてアミノ酸変異度が非常に高い領域が3ヶ所認められる。これらの領域は、それぞれ相補性決定領域(CDR) I、II、IIIと呼ばれ、抗原との直接の結合部位に当たり、抗原特異性を決定している。

本明細書においては、このIgのV<sub>H</sub>のCDR III部分を含有するタンパク質をコードしている遺伝子をイディオタイプ遺伝子と呼ぶ。

IgのV<sub>H</sub>は3種類の遺伝子領域(V<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>、J<sub>H</sub>)によってコードされ、B細胞の分化に伴い、これら3種の遺伝子断片が再構成を起こすことによってその多様性、すなわち、抗原特異性を獲得する。B細胞は分化に伴い、まず、約30個のD<sub>H</sub>遺伝子と6個のJ<sub>H</sub>遺伝子のうち、それぞれ1個の遺伝子断片が選ばれD<sub>H</sub>J<sub>H</sub>結合が起こり、続いて数十から数百個あるといわれるV<sub>H</sub>遺伝子のうちの1個の遺伝子断片が結合し、VDJ再構成を完成させる。これら再構成の過程で、どのV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>、J<sub>H</sub>遺伝子断片を使用するか、結合部位における遺伝子末端の多様性、V<sub>H</sub>D<sub>H</sub>およびD<sub>H</sub>J<sub>H</sub>結合部位へのNヌクレオチド(介在配列)の挿入によって、さらには、再構成完了後に、抗原刺激に基づく変異によってIg分子の高い多様性が獲得され、その結果が上記のCDR I、II、IIIの高いアミノ酸変異度へ反映されている。

とりわけ、CDR IIIは最も高い多様性を示し、末梢血B細胞における解析から、少なくとも30,000種以上のCDR IIIシーケンスの存在が示唆されている。したがって、B細胞リンパ腫は1個のB細胞由来の単クローン性増殖と考えられることより、この癌化した1個のB細胞

におけるCDR I I Iシーケンスを含有するIgのV<sub>H</sub>が腫瘍特異的遺伝子配列となる。

#### 発明の目的

上記の事情に鑑み、本発明はB細胞性悪性腫瘍、すなわち、B細胞性白血病、B細胞性悪性リンパ腫の治療に有用な、免疫強化作用を有する核酸分子を提供することを目的とする。

#### 発明の概要

B細胞性悪性腫瘍は、Ig遺伝子とその腫瘍特異的に再構成しており、腫瘍特異抗原となっている。本発明者らは、新たにそのIgのV<sub>H</sub>のCDR I I I部分を含有するV<sub>H</sub>タンパク質をコードするイディオタイプ遺伝子を単離し、この遺伝子を発現ベクターに連結した核酸分子を調製し、生体に投与したところ、抗イディオタイプ抗体、さらに細胞性免疫を誘導することに成功し、本発明を完成するに至った。

本発明の第1の発明は、ヒトB細胞性悪性腫瘍細胞に特異的な免疫グロブリン分子のV<sub>H</sub>のCDR I I I部分を含有するV<sub>H</sub>タンパク質を発現可能なB細胞性悪性腫瘍治療用核酸分子である。

第2の発明は該B細胞性悪性腫瘍治療用核酸分子の製造方法である。

第3の発明は該核酸分子を有効成分として含有する医薬組成物である。

また、第4の発明は該核酸分子が発現するタンパク質である。

また、第5の発明は該核酸分子の有効量をそれを必要とする対象に投与することよりなるB細胞性悪性腫瘍を治療する方法である。

さらに、第6の発明は該核酸分子の有効量をそれを必要とする対象に投与することよりなる細胞性免疫増強方法である。

### 図面の簡単な説明

実施例 8 の CTL 活性測定結果を示すグラフである。

### 発明の詳細な説明

以下、本発明を説明する。

本発明のヒト B 細胞性悪性腫瘍細胞に特異的な免疫グロブリン分子の  $V_H$  の CDR I I I 部分を含有する  $V_H$  タンパク質を発現可能な B 細胞性悪性腫瘍治療用核酸分子は、つぎの工程 (a) ~ (e) :

- (a) ヒト B 細胞性悪性腫瘍細胞より核酸を分離する工程、
  - (b) 得られた核酸を逆転写 (RT) し、cDNA を調製する工程、
  - (c) 免疫グロブリンの  $V_H$  の CDR I I I 部分を含有する  $V_H$  タンパク質をコードするイディオタイプ遺伝子上流および下流に存在する保存領域の一部を含有する核酸断片をプライマーとして用いて PCR を行い、増幅し、増幅された免疫グロブリン分子の  $V_H$  のイディオタイプ遺伝子を単離する工程、
  - (d) 単離されたイディオタイプ遺伝子を発現ベクターに連結し、B 細胞性悪性腫瘍治療用 DNA 分子を構築する工程、および、要すれば、
  - (e) B 細胞性悪性腫瘍治療用核酸分子を製造する工程、
- で製造することができる分子および得られた核酸分子の塩基の 1 つ以上が加入、変更および/または削除された所望の活性を保持した核酸分子を包含する。

すなわち、本発明においては、まず、B 細胞性悪性腫瘍細胞特異的な Ig の  $V_H$  のイディオタイプ遺伝子を知ることが必要となる。そこで、工程 (a) でヒト B 細胞性悪性腫瘍細胞より核酸を分離し、工程 (b) にお



いて、得られた核酸からRT反応によりcDNAを調製する。

イディオタイプ遺伝子はDh遺伝子、VhDhおよびDhJh結合部位によってコードされているために、イディオタイプ遺伝子両端に位置するVhおよびJh領域の比較的保たれた塩基配列部を選び、イディオタイプ遺伝子増幅のためのコンセンサスプライマーを合成し、工程(c)において、これらのプライマーを用い、工程(b)で調製したcDNAから、PCR法でイディオタイプ遺伝子を増幅後、クローニングベクターに組み込み遺伝子配列を決定することができる。腫瘍特異的イディオタイプ遺伝子が得られたら、工程(d)において、当該イディオタイプ遺伝子を単離し、発現ベクターに組み込み、B細胞性悪性腫瘍治療用DNA分子を構築し、要すれば、工程(e)において、本発明の核酸分子の生産量を増大させる。

工程(a)は、例えば、B細胞性悪性腫瘍の患者より採取した血液、またはリンパ節等の腫瘍中のB細胞より、RNAを分離調製する工程であり、種々の公知の方法が採用できる。例えば、血液の場合、フィコール法でリンパ球を分離し、該リンパ球より酸グアニジン・フェノールクロロホルム(AGPC)抽出法等によりRNAを調製してもよく、また、少量の血液からRNAを調製する方法である陽イオン界面活性剤を使用することもできる。

工程(b)は、工程(a)で分離された核酸を用いて、オリゴdTをプライマーとし、例えば、モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)またはトリ骨髄芽球ウイルス(AMV)由来の酵素のごとき逆転写酵素を用い、RT反応によりcDNAを調製する工程である。

工程(c)は、得られたcDNAを用いて、2種のプライマーを組み合わせてPCRを行う工程である。得られたRT-PCR産物を、例えば、フェノール/クロロホルム-イソアミルアルコールで処理後、Sal Iや

Pst I のような制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動後、NaI 法等によりイディオタイプ遺伝子を含有するDNA断片を精製する。このDNA断片とイー・コリ (E. coli) 複製プラスミドを接続し、イー・コリで増加させ、イディオタイプ遺伝子を単離する。

単離したイディオタイプ遺伝子のシーケンスを行うことにより、アミノ酸配列が決定できる。例えば、配列表の配列番号1および4のプライマーを用いて3症例について実施し、配列番号5～7の塩基配列を決定した。これらの塩基配列より、配列番号8～10のアミノ酸配列を決定した。

また、配列番号2および4のプライマーを用いて1症例について実施し、配列番号11の塩基配列を決定した。この塩基配列より、配列番号12のアミノ酸配列を決定した。また、イディオタイプ遺伝子の増幅は、配列番号3および4のプライマーを使用してもよい。さらに、配列番号2のミックスプライマーに代え、配列番号13のプライマーを使用してもよい。また、配列番号3のプライマーに代え、配列番号14のプライマーを使用してもよい。

工程(d)は、工程(c)で得られた腫瘍特異的イディオタイプ遺伝子を発現ベクターに組み込む工程である。発現ベクターとしては、例えば、pRc/CMV、pSinRep5 (インビトロゲン社製)、SEMLIKI FOREST VIRUS BASED VECTORS [Vaccine, 12, 1510-1514(1994)]、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター由来の発現ベクター等が挙げられ、特に、LRNL (Virology 171, 331 (1989))、LNCX、LXSN等のレトロウイルスベクターが好ましい。例えば、LRNLをBamHI、SalIなどの制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動後、NaI 法等により精製する。一方、上記のイディオタイプ遺伝子を含有するプラスミド、例えば、pBSV<sub>H</sub>を同様

にBamH I、Sal Iなどの制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動後、NaI法等により精製する。そして、両DNA断片をTakaraライゲーションキット（宝酒造製）等により接続し、イディオタイプ遺伝子を含有する発現用プラスミドpLV<sub>H</sub>RNLを構築する。

イディオタイプ遺伝子を発現用プラスミドに組込む際に、イディオタイプ遺伝子にタグ（tag）配列を付加することにより、発現タンパク質の検出を容易に行うことができる。タグ配列としては例えば配列表の配列番号15で表されるヘマグルチニンペプチドシーケンス（配列番号16）をコードするDNA配列があり、該ペプチドを認識する公知の抗体を使用することにより感度よく、発現ポリペプチドを検出することができる。タグ配列としては目的に応じ公知の配列を付加すればよく、特にヘマグルチニンペプチドをコードするDNA配列に限定されるものではない。

工程（e）は、工程（d）で得られたベクターを、適当な宿主を用いて増やし、B細胞性悪性腫瘍治療用核酸分子を含有するベクターを単離する工程である。このベクターをそのまま裸の（naked）DNAとして、適当な組成物の形で投与しようとする場合、イー・コリ（E.coli）K12等の宿主をイディオタイプ遺伝子を含有するベクターで形質転換し、得られた形質転換体を自体公知の方法で培養し、目的のベクターを回収すれば、B型細胞性悪性腫瘍治療用DNA分子を製造することができる。

さらに、工程（d）で得られたベクターを鋳型とし、in vitro transcription法にてB細胞悪性腫瘍治療用のmRNAを製造することができる。

また、ウイルスを用いる場合、レトロウイルス、アデノウイルス等を用いた方法があるが、①通常1コピーのみ宿主細胞のDNAに組み込まれるため、安定した遺伝子導入ができる、②ウイルス自体の細胞障害性が少な

い、③高力価のプロデューサー細胞を樹立すれば半永久的に使える等の理由から、レトロウイルスを用いたレトロウイルスベクターシステムが好ましい。このシステムは、レトロウイルスベクターとヘルパー細胞からなり、上記のLNRLを始めとするベクターにイディオタイプ遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターと、GP<sub>env</sub>A<sub>12</sub>、PA-317、psi-CRIP等のヘルパー細胞が使用される。そして、ヘルパー細胞が作っているウイルス粒子タンパク質にレトロウイルスベクターがパッケージングされたウイルス粒子、すなわちプロデューサー細胞が形成される。このプロデューサー細胞の培養上清に産生されるレトロウイルスを濃縮すれば、本発明のB細胞性悪性腫瘍治療用の核酸分子を含有するウイルス粒子を製造することができる。

かくして得られたB細胞性悪性腫瘍治療用の核酸分子は、部位特異的変異誘発法などの自体公知の方法で、所望の活性を損なうことなく、1つ以上の塩基を加入、変更および／または削除することにより改変でき、そのような改変し、かつ所望の活性を示す核酸分子も本発明範囲のものである。

この部位特異的変異誘発としては、ギャプド デュプレックス (gapped duplex) 法 [メソッズ イン エンザイモロジー, 第154巻, 第350～367頁 (1987)]、ウラシルDNA法 [メソッズ イン エンザイモロジー, 第154巻, 第367～382頁 (1987)]、亜硝酸法 [プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ USA (Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA), 第79巻, 第7258～7262頁 (1982)]、さらにカセット変異法 [ジーン (Gene), 第34巻, 第315～323頁 (1985)] が知られている。

さらに、得られたDNA分子を哺乳動物に投与し、イディオタイプ遺伝子を発現させるためには、裸のDNAとして投与する方法と、*in vitro* transcription 法で得られたmRNAを裸のRNAとして投与する方法と、ウイルス粒子にパッケージングさせて、例えば、レトロワクチンの形で投与する方法がある。裸のDNA、裸のRNAとして投与する場合、当然物理学的、化学的手段を組み合わせることもできる。物理的手段としては、パーティクルガン、エレクトロポレーション等が挙げられ、化学的手段としては、リピド等を用いた方法が挙げられる。

本発明の医薬組成物は、上記のヒトB細胞性悪性腫瘍細胞に特異的な免疫グロブリン分子のV<sub>H</sub>のCDRIII部分を含有するV<sub>H</sub>タンパク質を発現可能な核酸分子を有効成分とするヒトのB細胞性悪性腫瘍治療用の組成物である。

裸のDNA、またはRNAとして投与する場合、組成物は、医薬上許容される賦形剤、希釈剤を用い、投与に適した適宜の形態、例えば、油性または水性の賦形剤において、懸濁液、溶液または乳濁液の形態、また、水のような適当な賦形剤で再形成するために凍結乾燥形態のものでもよい。通常、皮下、皮内または筋肉内投与用のごとき非経口液体投与形態が好ましい。所望により、ショ糖、グリセロール、塩化ナトリウム等の等張化剤、さらにリポフェクチン、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンブロマイド等のリピド、リン酸カルシウム等を添加してもよい。さらに、リピドを適当に用いて、リポソーム製剤としてもよい。

裸のDNA、または裸のRNAとして投与する場合、本発明の医薬組成物は、通常、非経口投与、例えば、皮下、皮内または筋肉内に投与される。該有効成分の投与量は、個々の患者、実際の症状、投与経路等により変化するが、一般に、皮下投与の場合、核酸量として1日当たり1 $\mu$ g~10

mg/kg体重である。

例えば、上記のイディオタイプ遺伝子をpRc/CMV、レトロウイルスベクター由来の発現ベクター等の発現ベクターに連結して得られた本発明のベクターを裸のDNAとして、もしくは本発明のベクターによりin vitro transcription 法にて得られたmRNAを裸のRNAとして投与することにより、ワクチンとして効果を発揮させることができる。例えば、イディオタイプ遺伝子をLRNLに挿入し、pLV<sub>H</sub>LRNLを調製し、これをイー・コリに形質転換し、得られた形質転換体を自体公知の方法で培養し、プラスミドを回収精製後、シヨ糖溶液のような形で、患者に皮下、皮内または筋肉内に投与すると、患者の血中に抗イディオタイプ抗体、さらに、細胞性免疫を誘導することができる。

ウイルス粒子として投与する場合、組成物は医薬上許容される賦形剤、希釈剤を用い、投与に適した適宜の形態、例えば、油性または水性の賦形剤において、懸濁液、溶液、または乳濁液の形態、また、水のような適当な賦形剤で再形成するために凍結乾燥形態のものでもよい。通常、投与の際は液体投与形態が好ましい。所望により、シヨ糖、グリセロール、塩化ナトリウム等の等張化剤、さらにリポフェクチン、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンプロマイド等のリピド、リン酸カルシウム、polybrene、硫酸プロタミン等を添加してもよい。

ウイルス粒子として投与する場合、経口投与、非経口投与いずれの方法でもよく、投与量は個々の患者、実際の症状、投与経路等により変化するが、ウイルス粒子中に含まれる本発明の核酸分子、すなわちポリヌクレオチド量として1日当たり1 $\mu$ g~1mg/kg体重、また、ウイルス量として1日当たり10<sup>3</sup>~10<sup>7</sup>cfu/kg体重である。

例えば、上記のイディオタイプ遺伝子をレトロウイルスベクター、アデ

ノウイルスベクター由来の発現ベクター等の発現ベクターに連結して得られた本発明のベクターを、ウイルス粒子に取り込ませ、このウイルス粒子を患者に投与することにより、ワクチンとして効果を発揮させることができる。例えば、レトロウイルスの場合、上記のpLV<sub>H</sub>RNLをGP<sub>env</sub>A<sub>12</sub>等のヘルパー細胞に遺伝子導入、導入細胞より産出される本発明の核酸分子をRNA分子として取り込んだウイルス粒子を集め、投与すればよい。

本発明の核酸分子を裸のDNA、もしくは裸のRNAとして投与する場合、また、ウイルス粒子として投与する場合において、これらの投与量範囲において、格別な副作用も認められず、良好な治療効果が達成される。

患者に本発明の核酸分子を投与した後、ワクチンとしての効果を確認するために、抗イディオタイプ抗体の産生を誘導できたかどうかを確認する必要がある。そのために、イディオタイプ遺伝子がコードするV<sub>H</sub>タンパク質を用いることにより、抗体の有無を測定し、免疫系を強化できているかどうか診断することができる。

本発明のタンパク質は、かかるタンパク質として使用できる。該タンパク質を調製するには、イディオタイプ遺伝子を、例えば、イー・コリ用の発現ベクターに組み込み、V<sub>H</sub>タンパク質を単離することができる。必要に応じてマルトース結合タンパク質や前記ヘマグルチニンペプチド等とのキメラタンパク質として調製することも可能である。

得られたタンパク質は免疫活性化状態の検査（モニタリング）に有用であり、そのような検査試薬またはキットの一成分として使用できる。

また、前記したことから分かるように、本発明の核酸分子は、それを必要とする対象に投与することにより、B細胞性悪性腫瘍を治療し、また、

細胞性免疫を増強することができ、かかるB細胞性悪性腫瘍の治療方法および細胞性免疫増強方法も本発明の範囲内である。投与に際しては、前記したのと同様の範囲の投与量が用いられる。

本発明の核酸分子は、従来用いられていたヒトB細胞性悪性腫瘍に特異的な免疫グロブリン分子のV<sub>H</sub>をコードする核酸分子を含有しなくても、強いワクチン効果を有する。従って、個々のB細胞性悪性腫瘍に特異性の高い、ワクチンとして有用な核酸分子を極めて簡便に製造することができる。

つぎに実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。

#### 実施例 1

##### 核酸 (RNA) の抽出

B細胞性白血病の患者より採取した血液中のB細胞より、RNAを以下のごとくして分離した。

B細胞性白血病の患者から採血した血液を0.31%クエン酸ナトリウム処理し、その処理液1mlをリン酸緩衝液で2倍に希釈した後、フィコール（ヒトリンパ球分離用）1mlに重層し、25℃で遠心分離を行い、リンパ球層を集めた。リン酸緩衝液で十分に洗浄した後、細胞にグアニジンイソチオシアネート（またはグアニジンチオシアネート）を加え、細胞を溶解させた。

溶解後の細胞抽出液をフェノール、クロロホルム処理をした後、2-ブロパノール沈殿を行い、RNAを回収した。該RNAは-80℃にて保存し、使用時に10μlのトリス・EDTA緩衝液に溶解した。

#### 実施例 2

##### cDNAの調製



実施例1で得られたRNA (5  $\mu$ g) を水 (11  $\mu$ l) に懸濁し、80℃で3分間保持した後、5倍濃縮反応緩衝液混合液10  $\mu$ lに0.1M DTT (5  $\mu$ l)、2.5mM dNTP混合液 (20  $\mu$ l)、1  $\mu$ g/ $\mu$ lのdT<sub>12-18</sub> (ファルマシア社製) (1  $\mu$ l)、RTアーゼ (BRL MMLV 200 U/ $\mu$ l) (2  $\mu$ l) およびRNアーゼインヒビター (40 U/ $\mu$ l) (1  $\mu$ l) を添加し、37℃で1時間反応させた後、92℃で5分間加熱し、ついで氷冷し、対応するcDNAを調製した。これを-20℃で保存した。

### 実施例3

#### イディオタイプ遺伝子の単離

実施例2で得られたcDNAの1例に、配列表の配列番号2 (V<sub>H</sub>領域のsense側プライマー) および配列番号4 (V<sub>H</sub>領域のantisense側プライマー) で示す2種のプライマーを組み合わせ、以下のとおりPCRを行った。

実施例2のcDNA (2  $\mu$ l) を10倍濃縮反応緩衝液 (5  $\mu$ l)、25 mM MgCl<sub>2</sub> (3  $\mu$ l)、1.25mM dNTP (8  $\mu$ l)、各プライマー (100 pmol/ $\mu$ l) (0.5  $\mu$ lずつ)、Taq酵素 (5ユニット/ $\mu$ l、0.5  $\mu$ l) および水 (30.5  $\mu$ l) と合し、94℃に40秒、62℃に40秒ついで72℃に1分の保持を35サイクル繰り返した。

得られたRT-PCR産物を、フェノール/クロロホルム-イソアミルアルコールで1回、クロロホルム-イソアミルアルコールで1回処理した後、エタノールを加えて遠心分離し、上清を除き、沈殿物を減圧乾固し、この乾固分をSal IおよびPst Iで切断し、NaI法でイディオタイプ遺伝子を含むDNA断片を精製した。

一方、イー・コリ複製プラスミドとして、Bluescript (SK) 1-1 (ストラタジーン社製) をSal IおよびPst Iで切断し、上記と同様な

NaI 法によりDNA断片を精製した。

このDNA断片を、上記のイディオタイプ遺伝子を含有するDNA断片とTakaraライゲーションキット（宝酒造製）により接続し、イディオタイプ遺伝子を含有するプラスミドpBSV<sub>H</sub>を構築した。

このプラスミドをイー・コリDH5 $\alpha$ へ形質転換し、得られた形質転換体をLプロスで37℃、一晚培養し、プラスミドを回収して、イディオタイプ遺伝子を含有するpBSV<sub>H</sub>を単離した。

このようにして得たイディオタイプ遺伝子の配列を配列表の配列番号1に示す。また、アミノ酸配列を配列番号12に示す。

なお、配列番号1、2、3、13において、開始コドンATGより下流領域が必須であり、それより上流側（5'側）は制限酵素切断部位があれば特に限定するものではない。また、配列番号4において停止コドンTCA（TGA）より下流（3'側）は必須であり、上流側（5'側）は制限酵素切断部位があれば特に限定するものではない。

つぎに、配列番号1および配列番号4で示す2種のプライマーを組み合わせ、3症例のB細胞性白血病患者のイディオタイプ遺伝子のCDRI<sub>1</sub>部分をコードする遺伝子の塩基配列を決定した。該遺伝子の塩基配列を配列番号5～7に、そのアミノ酸配列を配列番号8～10に示す。

#### 実施例4

##### 発現ベクターへの連結

LRNLを制限酵素BamHI、SalIで切断し、上記と同様にNaI法により精製した。

一方、上記のイディオタイプ遺伝子を含有するプラスミドpBSV<sub>H</sub>を同様に制限酵素BamHI、SalIで切断し、NaI法で精製した。

両DNA断片をTakaraライゲーションキットにより接続し、イディオ

タイプ遺伝子を含有する発現用プラスミドpLV<sub>H</sub>RNLを構築した。

#### 実施例 5

##### B細胞性悪性腫瘍治療用核酸分子の調製

上記プラスミドpLV<sub>H</sub>RNLを、イー・コリDH5 $\alpha$ へ形質転換した。得られた形質転換体をLブロスで37℃にて、一晚培養し、プラスミドを回収した。

このようにしてB細胞性悪性腫瘍治療用DNA分子を単離した。

#### 実施例 6

##### V<sub>H</sub>タンパク質（マルトース結合タンパク（MBP）との融合タンパク）の調製

イー・コリ発現用ベクターpMAL-c2を制限酵素Pst I、Sal Iで切断し、上記と同様に、NaI法により精製した。

一方、上記のイディオタイプ遺伝子を含有するプラスミドpBSV<sub>H</sub>を同様に制限酵素Pst I、Sal Iで切断し、NaI法により精製した。

両DNA断片をTakaraライゲーションキットにより接続し、イディオタイプ遺伝子を含有するイー・コリ発現用プラスミドを構築した。

このプラスミドをイー・コリDH5 $\alpha$ へ形質転換し、得られた形質転換体をLブロスで37℃、一晚培養した。得られた菌体を超音波破碎してタンパク質を抽出し、抽出物よりアミロースレジン（NEB社製）を用いて、V<sub>H</sub>-MBP融合タンパク質を精製した。この融合タンパク質をプロテアーゼ（DENZYME社製造Factor Xa）で処理し、精製してV<sub>H</sub>タンパク質部分を単離した。

#### 実施例 7

##### マウスの免疫

pLV<sub>H</sub>RNLの水溶液（100 $\mu$ l）（0.2mg/ml）をDBA/2マウ

スに1週おきに3回皮内注射し、投与局所に電気パルスを負荷した。最終投与後、1週間のマウスの眼窩よりキャピラリー法にて採血し(100~200  $\mu$ l)、血清を調製し、実施例6で得られたV<sub>H</sub>タンパク質を用いて、つぎのように免疫活性を測定した。

上記で調製したV<sub>H</sub>-MBP融合タンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後、メンブランフィルターにトランスファーした。つぎにスキムミルクでブロッキング後、上記のようにして得られたマウス血清の50倍希釈液と1時間反応させた。洗浄後、二次抗体(horseradish-peroxidase結合 Anti-mouse Ig)を加え、1時間反応後、洗浄し、ECLを用いてV<sub>H</sub>タンパク質に特異的な抗V<sub>H</sub>抗体の有無を検出した。

ウエスタン・ブロッティング法により、pLV<sub>H</sub>RNL投与群(1群3匹)の血液中に、48KDの位置のV<sub>H</sub>-MBPに特異的に結合する抗V<sub>H</sub>抗体が誘導できることを確認した。一方、LRNL投与群の血清中には抗V<sub>H</sub>抗体は認められなかった。

#### 実施例8

##### CTL活性の測定法

##### 1. マウスの免疫

DBA/2マウスへpLV<sub>H</sub>RNL 20  $\mu$ g (100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O)、コントロール群はサケDNA 20  $\mu$ gを皮内注射し、これを1週間おきに3回繰り返した。3回目を注射した1週間後、それぞれのマウスの脾細胞を分離した。

##### 2. ターゲット細胞の調整

GP+E86細胞へリポフェクトアミン法によりpLV<sub>H</sub>RNL 20  $\mu$ gをトランスフェクションした。12時間後に培養上清を代え、さらに12時間後のレトロウイルスを含む培養上清をとり、ポリブレン5  $\mu$ g/mlとと

もにPIHTR細胞にレトロウイルスベクターLV<sub>H</sub>RNLのインフュクションを行った。48時間後よりG418, 500 µg/mlの濃度下に培養を行い、PIHTR/LV<sub>H</sub>RNLを樹立した。

### 3. PIHTR/LV<sub>H</sub>RNLによるマウス脾細胞の刺激

上記マウス脾細胞濃度が終濃度 $1 \times 10^7$ /ml、50 Gyの放射線照射を施したPIHTR/LV<sub>H</sub>RNLが終濃度 $0.5 \times 10^7$ /mlになるように調整し、24穴カルチャープレートにて5日間共培養した。培養開始後2日目と4日目に培養上清の2/3を新しい培養液と交換した。

### 4. CTL活性の測定

上記2で得られたPIHTR/LV<sub>H</sub>RNL $1 \times 10^6$ /0.5mlを<sup>51</sup>Crでラベリングした。2時間後細胞を洗い、5mlの培養液に浮遊させた。これを96穴プレートに $2 \times 10^4$ /100 µlで分注した。これに、上記3にて共培養して得られたマウス脾細胞を $1 \times 10^6$ /100 µlまたは $2 \times 10^5$ /100 µl加えた。これらは、それぞれtriplicateで調整した。バックグラウンドおよび最大放射活性値を測定するため<sup>51</sup>CrでラベリングしたPIHTR/LV<sub>H</sub>RNLのみ $2 \times 10^4$ /200 µlで調整したウェルを、それぞれ3ウェルずつ作っておいた。8時間37℃で培養後、培養上清100 µlをとりバックグラウンドをカウントした。また、最大放射活性値は、細胞をピペティング後、100 µlをとって測定した。

結果を図1に示す。図1に示すように、pLV<sub>H</sub>RNLで免疫した系で、エフェクター ターゲット (E/T) 比率10:1、50:1にて20~25%のkillingが特異的にみられた。

### 実施例9

遺伝子導入ベクターを投与後、局所に電気パルスを負荷した。導入ベクターとしては、LNR<sub>L</sub>にLacZ遺伝子を組み込んだpLZRNLおよび

上記のpLV<sub>H</sub>RNLを用いた。マウス（DBA／2）またはKSN ノードマウスに遺伝子導入ベクターを皮下または皮内に投与して電気パルスを行った。電気パルスは、BTX2000 electroporation unitを用い、電極間の距離を測定し400～600V/cmの電圧にて99  $\mu$ secの間隔でsquare-wave pulsesで毎秒1回で8回連続して負荷した。

このような方法で、3回免疫し、組織、血清を取って調べた。pLZRNLを用いた場合においては、導入部位組織を用いてlacZ染色を行い遺伝子の導入された細胞を確認した。pLV<sub>H</sub>RNLを用いる場合においては、pLV<sub>H</sub>RNL 20  $\mu$ gを1週間ごとに計3回、DBA／2マウスにおける皮下投与、電気パルスを負荷した後、マウス血中の抗V<sub>H</sub>抗体をウェスタンブロット法により検索した。陽性コントロールとして、上記実施例6記載のV<sub>H</sub>タンパク質部分、陰性コントロールとしてpLRNLを用いた。

電気パルス遺伝子導入（PEFGT）の条件としては、電極間の抵抗値は300～600 $\Omega$ でgapは8～10mm、設定電圧は皮下では200～400V、皮内では400～600Vであった。pLZRNLにおいては、皮内、皮下組織を染色した結果、皮下組織、皮下筋層に青く染色される細胞が見られた。pLV<sub>H</sub>RNLの系においては、PEFGT法により、マウス血中に抗V<sub>H</sub>抗体を誘導できることを確認し、電気穿孔法による遺伝子導入方法確立した。また、Naked DNA法でも同様の結果を得た。

以上記載したごとく、本発明によれば、B細胞性悪性腫瘍の治療に有用な核酸分子が提供される。

## 配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

CTGTCGACCA TGGCCGTGTA TTACTG 26

配列番号 : 2

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

AAGTCGACSA GATGCAGCTG STGSAGTCTG 30

配列番号 : 3

配列の長さ : 31

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

AAGTCGACCA TGGTGCAGCT GGTGCAGTCT G 31

配列番号：4

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TTCTGCAGTC AGGAGACGGT GACC 24

配列番号：5

配列の長さ：153

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：

CTGTCGACCA TGGCCGTGTA TTACTGTGCA CGGCCGCCAC CGCCCCTCTC AATTGATTAT 60

TGTAGTGGTG GTAGCTTGCC TCTCTCGACG AACAGCTTTG GAGGACTACT CTGGGGCCAC 120

CGCCCCCTGG TCACCGTCTC CTGACTGCAG GAA 153



配列番号 : 6

配列の長さ : 101

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 :

CTGTCGACCA TGGCCGTGTA TTACTGTGCG AAAGATCCCC GGGGTAGTAG TACACCTCAG 60

AAGGGCCAGG GAACCCTGGT CACCGTCTCC TGA CTGCAGA A 101

配列番号 : 7

配列の長さ : 116

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 :

CTGTCGACCA TGGCCGTGTA TTACTGCAAG AGATTAGGGG TAGTGGCTAC GGTCACCTTC 60

TACGGTATGG ACGTCTGGGG CCAAGGGACC ACGGTCACCG TCTCCTGACT GCAGAA 120

配列番号 : 8

配列の長さ : 44

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Pro Pro Pro Leu Ser Ile

1 5 10 15

Asp Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Leu Pro Leu Ser Thr Asn Ser Phe

20 25 30

Gly Gly Leu Leu Trp Gly His Arg Pro Leu Val Thr Val Ser

35 40

配列番号 : 9

配列の長さ : 27

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Arg Gly Ser Ser Thr

1 5 10 15

Pro Gln Lys Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

20

25

配列番号 : 10

配列の長さ : 32

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Lys	Arg	Leu	Gly	Val	Val	Ala	Thr	Val
1					5				10				15	
Thr	Phe	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr
					20				25				30	
Val	Ser													

配列番号 : 11

配列の長さ : 402

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

GTCGACCAGA TGCAGCTGGT GCAGTCTGGG GGAGGCTTGG TACAGCCTGG GGGGTCCCTG 60

AGACTCTCCT GTGCAGCCTC TGGATTACCC TTTAGCAGCT ATGCCATGAG CTGGGTCCGC 120

CAGGCTCCAG GGAAGGGGCT GGAGTGGGTC TCAGCTATTA GTGGTAGTGG TGGTAGCACA 180

TACTACGCAG ACTCCGTGAA GGGCCGGTTC ACCATCTCCA GAGACAATTC CAAGAACACG 240

CTGTATCTGC AAATGAACAG CCTGAGAGCC GAGGACACGG CCGTATATTA CTGTGCGAAA 300

GTTGTCCACC TATATTACTA TGATAGTAGT GGTATTACC CTGGGAACTA CCGTATGGAC 360

GTCTGGGGCC AAGGGACCAC GGTCACCGTC TCCTGACTGC AG 402

配列番号 : 12

配列の長さ : 128

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser

20 25 30

Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

- 27 -

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

AAGTCGACSA TGGTGCAGCT GSTGSAGTCT G 31

配列番号：15

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TACCCATACG ATGTTCCAGT TTACGCT 27

配列番号：16

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1

5

## 請求の範囲

1. ヒトB細胞性悪性腫瘍細胞に特異的な免疫グロブリン分子の(H)鎖可変部領域(V<sub>H</sub>)の相補性決定領域(CDR) I I I部分を含有するV<sub>H</sub>タンパク質を発現可能なB細胞性悪性腫瘍治療用核酸分子。
2. 下記工程により製造することのできる請求項1記載の核酸分子。
  - (a) ヒトB細胞性悪性腫瘍細胞より核酸を分離する工程、
  - (b) 得られた核酸を逆転写し、cDNAを調製する工程、
  - (c) 免疫グロブリンのV<sub>H</sub>のCDR I I I部分を含有するV<sub>H</sub>タンパク質をコードするイデオタイプ遺伝子上流および下流に存在する保存領域の一部を含有する核酸断片をプライマーとして用いてPCRを行い、増幅し、増幅された免疫グロブリン分子のV<sub>H</sub>イデオタイプ遺伝子を単離する工程、および
  - (d) 単離されたイデオタイプ遺伝子を発現ベクターに連結し、B細胞性悪性腫瘍治療用DNA分子を構築する工程。
3. CDR I I I部分を含有するV<sub>H</sub>タンパク質が配列番号8~10および12から選択されるアミノ酸配列を有するタンパク質である請求項1記載の核酸分子。
4. PCRにおいて使用される核酸断片が、配列番号1および4、配列番号2および4、配列番号3および4、配列番号13および4、配列番号14および4でそれぞれ表される一対の核酸断片から選択される一対の核酸断片である請求項2記載の核酸分子。
5. 発現ベクターがレトロウイルスベクター由来の発現ベクターである請求項2記載の核酸分子。
6. イー・コリ(E. coli)にて生産する請求項2記載の核酸分子。

7. in vitroにてtranscription 法にて生産する請求項2記載の核酸分子。

8. ウイルス粒子産生細胞にて生産する請求項2記載の核酸分子。

9. 下記工程からなることを特徴とするB細胞性悪性腫瘍治療用核酸分子の製造方法。

(a) ヒトB細胞性悪性腫瘍細胞より核酸を分離する工程、

(b) 得られた核酸を逆転写し、cDNAを調製する工程、

(c) 免疫グロブリンのV<sub>H</sub>のCDRIII部分を含有するV<sub>H</sub>タンパク質をコードするイディオタイプ遺伝子上流および下流に存在する保存領域の一部を含有する核酸断片をプライマーとして用いて、PCRを行い、増幅し、増幅された免疫グロブリン分子のイディオタイプ遺伝子を単離する工程、

(d) 単離されたイディオタイプ遺伝子を発現ベクターに連結し、B細胞性悪性腫瘍治療用DNA分子を構築する工程、および

(e) B細胞性悪性腫瘍治療用核酸分子を製造する工程。

10. PCRにおいて使用される核酸断片が、配列番号1および4、配列番号2および4、配列番号3および4、配列番号13および4、配列番号14および4でそれぞれ表される一対の核酸断片から選択される一対の核酸断片である請求項9記載の製造方法。

11. 発現ベクターがレトロウイルスベクター由来の発現ベクターである請求項9記載の製造方法。

12. B細胞性悪性腫瘍治療用核酸分子をイー・コリ (E. coli) で製造する請求項9記載の製造方法。

13. B細胞性悪性腫瘍治療用核酸分子をin vitro transcription 法にて製造する請求項8記載の製造方法。



14. B細胞性悪性腫瘍治療用核酸分子をウイルス粒子産生細胞にて生産する請求項9記載の製造方法。

15. 請求項1記載の核酸分子を有効成分とする医薬組成物。

16. 請求項1記載の核酸分子を含有するウイルス粒子を有効成分とする医薬組成物。

17. 請求項1記載の核酸分子が発現するタンパク質。

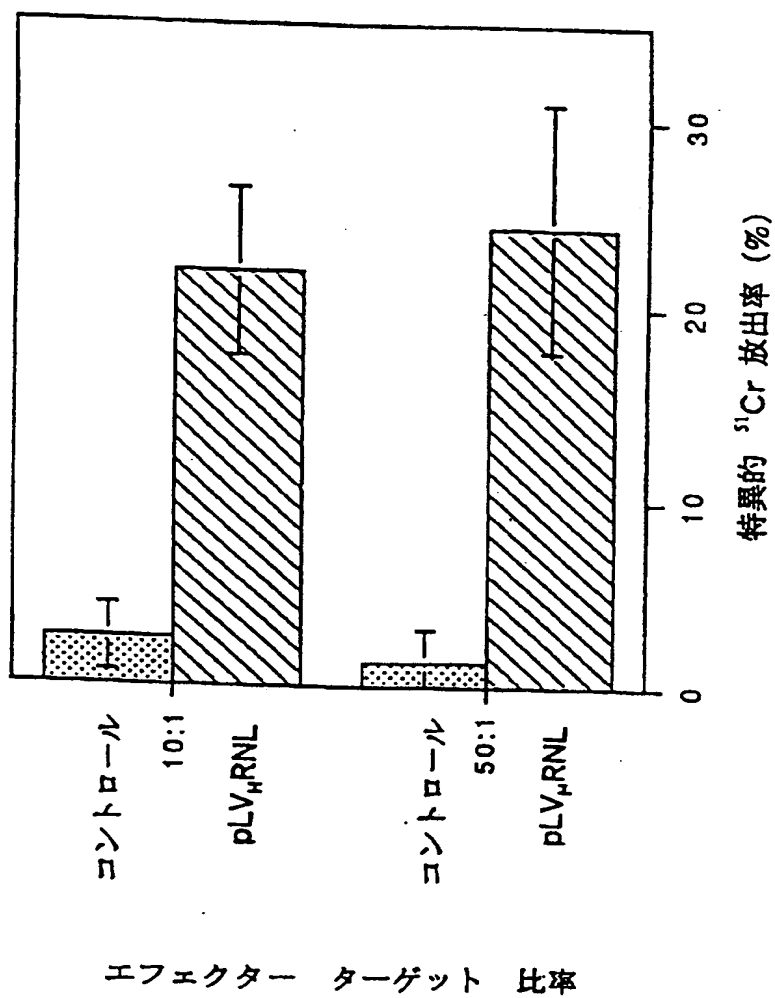
18. 請求項1記載の核酸分子の、B細胞性悪性腫瘍治療用医薬組成物の製造における使用。

19. 請求項17記載のタンパク質の、B細胞性悪性腫瘍に対する免疫活性検査用試薬の製造における使用。

20. 請求項1記載の核酸分子の有効量をそれを必要とする対象に投与することを特徴とするB細胞性悪性腫瘍を治療する方法。

21. 請求項1記載の核酸分子の有効量をそれを必要とする対象に投与することを特徴とする細胞性免疫増強方法。

図 1



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01258

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. Cl <sup>6</sup> C12N15/13, C12N15/63, C12P21/02, A61K48/00, C07H21/04, C07K14/435 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl <sup>6</sup> C12N15/02-15/90 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L, CAS ONLINE, GENETYX		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RUDDERS, R.A. et al. "Crossreacting human lymphoma idiotypes", Blood (1992), Vol. 80, No. 4, p. 1039-1044	1-19, 21
A	REIDL, L.S. et al. "Structural basis of a conserved idiotype expressed by an autoreactive human B cell lymphoma", J. Immunol. (1991), Vol. 147, No. 10, p. 3623-3631	1-19, 21
A	BROWN, S.L. et al. "Treatment of B-cell lymphomas with anti-idiotypic antibodies alone and in combination with alpha interferon", Blood (1989), Vol. 73, No. 3, p. 651-661	1-19, 21
A	KWAK, L.W. et al. "Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors", New Engl. J. Med. (1992), Vol. 327, No. 17, p. 1209-1215	1-19, 21
A	WO, 94/8008, A (Medical Res. Council),	1-19, 21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search August 6, 1996 (06. 08. 96)		Date of mailing of the international search report August 20, 1996 (20. 08. 96)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP96/01253

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	April 14, 1994 (14. 04. 94) & AU, 9348324, A & EP, 663008, A	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01258

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 20  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The invention of Claim 20 pertains to methods for treatment of the human or animal body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 15/13, C12N 15/63, C12P 21/02, A61K 48/00, C07H 21/04, C07K 14/435

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 15/02 - 15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L, CAS ONLINE, GENETYX

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	RUDDERS, R. A. et al. "Crossreacting human lymphoma idiotypes", Blood (1992) 第80巻, 第4号, p. 1039-1044	1-19, 21
A	REIDL, L. S. et al. "Structural basis of a conserved idotype expressed by an autoreactive human B cell lymphoma", J. Immunol. (1991) 第147巻, 第10号, p. 3623-3631	1-19, 21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.08.96

国際調査報告の発送日

20.08.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐伯 裕子

4 B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	BROWN, S. L. et al. "Treatment of B-cell lymphomas with anti-idiotypic antibodies alone and in combination with alpha interferon", Blood (1989) 第73巻, 第3号, p. 651-661	1-19, 21
A	KWAK, L. W. et al. "Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors", New Engl. J. Med. (1992) 第327巻, 第17号, p. 1209-1215	1-19, 21
A	WO, 94/8008, A (Medical Res. Council) 14. 4月. 1994 (14. 04. 94) & AU, 9348324, A & EP, 663008, A	1-19, 21

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 20 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲第20に記載された発明は、人又は動物の身体の治療による処置方法に関するものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。